

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11) Publication number : **11-199500**

(43) Date of publication of application : **27.07.1999**

(51) Int.Cl.

A61K 35/78

A61K 35/78

A61K 35/78

A23L 1/162

A23L 1/164

A23L 1/30

A23L 2/38

A61K 7/00

A61K 7/48

A61K 7/50

(21) Application number : **10-001766**

(71) Applicant : **NISSIN FOOD PROD CO LTD**

(22) Date of filing : **07.01.1998**

(72) Inventor : **SHOJI FUMIKO**

ITO KAZUNORI

TABATA SHINOBU

SUGIMOTO MAMORU

ISHII TAKAYUKI

(54) ATOPIC DERMATITIS THERAPEUTIC AGENT

(57) Abstract:

PROBLEM TO BE SOLVED: To find out an effective inhibitor against adhesion of leukocyte from plants mainly consisting of crude drugs which seldom show adverse drug reactions and to provide it as a medicine, a quasi-drug, a cosmetic and a food capable of using for a long period of time.

SOLUTION: This invention relates to the preventive or therapeutic agent against IV type allergy and atopic dermatitis, the cosmetic and the food composition which include one or more than two kinds of plants selected from Chrysanthemum morifolium flower, Terminalia chebula fruit, Morus bombycis fruit, Geum japonicum, Arctostaphylos uvaursi, Dioscorea tokoro, Rosa hybrida, Cuminum cyminum and Eugenia caryophyllata or at least one kind of Solidago Virga-aurea, Polygala tenuifolia root, Dianthus chinensis, Platycodon grandiflorum root, Calendula arvensis (pot marigold), Capsicum annum (red pepper), Anemarrhena asphodeloides rhizome, Humulus lupulus and Lonicera japonica as active ingredients.

LEGAL STATUS

[Date of request for examination]

[Date of sending the examiner's decision of rejection]

[Kind of final disposal of application other than the examiner's decision of rejection or application converted registration]

[Date of final disposal for application]

[Patent number]

[Date of registration]

[Number of appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of requesting appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of extinction of right]

(19)日本国特許庁 (JP)

(12) 公開特許公報 (A)

(11)特許出願公開番号

特開平11-199500

(43)公開日 平成11年(1999)7月27日

(51)Int.Cl.⁶
A 61 K 35/78

識別記号
ADA

F I
A 61 K 35/78

ADAT
N
C
D
R

審査請求 未請求 請求項の数 6 O L (全 10 頁) 最終頁に続く

(21)出願番号 特願平10-1766

(22)出願日 平成10年(1998)1月7日

(71)出願人 000226976

日清食品株式会社
大阪府大阪市淀川区西中島4丁目1番1号

(72)発明者 庄子 富美子

大阪府大阪市淀川区西中島4丁目1番1号
日清食品株式会社内

(72)発明者 伊藤 和徳

大阪府大阪市淀川区西中島4丁目1番1号
日清食品株式会社内

(72)発明者 田端 忍

大阪府大阪市淀川区西中島4丁目1番1号
日清食品株式会社内

(74)代理人 弁理士 三枝 英二 (外10名)

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 アトピー性皮膚炎治療剤

(57)【要約】

【課題】 アトピー性皮膚炎の予防ないし治療剤、化粧料及び食品を提供する。

【解決手段】菊花、訶子、菱実、大根草、ウワウルシ、ヤロー、ローズ、クミンおよびクローブから選ばれる1種もしくは2種以上の植物或いはアキノキリンソウ、オレンジ、クバク、キキョウ、ポットマリーゴールド、レッドペッパー、チモ、ホップ及びニンドウの1種以上を有効成分とするIV型アレルギー及びアトピー性皮膚炎の予防ないし治療剤、化粧料及び食品組成物とするものである。

【特許請求の範囲】

【請求項1】菊花、訶子、菱実、大根草、ウワウルシ、ヤロー、ローズ、クミン、クローブ、アキノキリンソウ、オニジ、クバク、キキョウ、ポットマリーゴールド、レッドペッパー、チモ、ホップ及びニンドウからなる群から選ばれる1種もしくは2種以上の植物またはその抽出物を含むアトピー性皮膚炎の予防ないし治療剤。

【請求項2】菊花、訶子、菱実、大根草、ウワウルシ、ヤロー、ローズ、クミン、クローブ、アキノキリンソウ、オニジ、クバク、キキョウ、ポットマリーゴールド、レッドペッパー、チモ、ホップ及びニンドウからなる群から選ばれる1種もしくは2種以上の植物またはその抽出物を含むIV型アレルギーの予防ないし治療剤。

【請求項3】菊花、訶子、菱実、大根草、ウワウルシ、ヤロー、ローズ、クミン、クローブ、アキノキリンソウ、オニジ、クバク、キキョウ、ポットマリーゴールド、レッドペッパー、チモ、ホップ及びニンドウからなる群から選ばれる1種もしくは2種以上の植物またはその抽出物及び食品成分を含むアトピー性皮膚炎の予防ないし治療作用を有する食品組成物。

【請求項4】菊花、訶子、菱実、大根草、ウワウルシ、ヤロー、ローズ、クミン、クローブ、アキノキリンソウ、オニジ、クバク、キキョウ、ポットマリーゴールド、レッドペッパー、チモ、ホップ及びニンドウからなる群から選ばれる1種もしくは2種以上の植物またはその抽出物及び食品成分を含むIV型アレルギーの予防ないし治療作用を有する食品組成物。

【請求項5】菊花、訶子、菱実、大根草、ウワウルシ、ヤロー、ローズ、クミン、クローブ、アキノキリンソウ、オニジ、クバク、キキョウ、ポットマリーゴールド、レッドペッパー、チモ、ホップ及びニンドウからなる群から選ばれる1種もしくは2種以上の植物またはその抽出物を含むアトピー性皮膚炎の予防ないし治療作用を有する化粧料。

【請求項6】菊花、訶子、菱実、大根草、ウワウルシ、ヤロー、ローズ、クミン、クローブ、アキノキリンソウ、オニジ、クバク、キキョウ、ポットマリーゴールド、レッドペッパー、チモ、ホップ及びニンドウからなる群から選ばれる1種もしくは2種以上の植物またはその抽出物を含むIV型アレルギーの予防ないし治療作用を有する化粧料。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は、植物またはその抽出物を有効成分とするIV型アレルギー及びアトピー性皮膚炎の予防ないし治療剤、並びにIV型アレルギー及びアトピー性皮膚炎の予防ないし治療作用を有する食品組成物及び化粧料に関する。

【0002】

【従来の技術】アトピー性皮膚炎は、多くの乳幼児に発

症し、加齢とともに皮疹が変化する慢性の皮膚疾患で、既往も含めると2歳以下の乳児の30%はアトピー性皮膚炎と診断されている。このアトピー性皮膚炎は、アトピー素因のある者に発症し、強い痒みと慢性の経過をとる湿疹で、乾燥した苔癬状の皮膚が特徴であって、じん麻疹を繰り返してもアトピー性皮膚炎のような肌になることはない。近年、生活環境の変化、食生活の欧米化、住宅構造の密閉化、ストレスの増大等による原因から、アトピー性皮膚炎が先進工業国において高く発症し、現在も増加傾向にある。アトピー性皮膚炎の多くは乳幼児から発症して成長とともに軽快傾向を示すが、近ごろでは成人型や難治性のアトピー性皮膚炎も急増しており、社会問題化している。

【0003】アレルギー反応の作用機序はI型～IV型までの4つの型に大別分類される。アトピー性皮膚炎はそのうちI型とIV型が関与する皮膚炎と考えられる。前者I型アレルギーは主にIgE抗体が関与した即時型アレルギーで、直接湿疹病変に結びつかないとされ、湿疹に関与するアレルギー型は、後者のIV型アレルギーであると言われている。IV型アレルギーは遅延型アレルギーもしくは細胞伝達型と呼ばれ、抗体は関与せず、各種リンパ球、特に白血球を介して行われる炎症反応である。他のアレルギーの型と異なり、感作されてから炎症の反応まで24～72時間ほどかかる。

【0004】IV型アレルギー炎症が発生するまでの過程として、まず、抗原がマクロファージによって認識され、その情報が抗原反応性T細胞に伝達されるとT細胞の分裂が行われる。感作の成立している個体に再度抗原が侵入すると、活性化されたリンパ球からリンゴカインが放出され、それによって局所に集められた白血球より、炎症誘起物質が放出され、炎症が起こる（生化学辞典第2版、東京化学同人；免疫学用語辞典、最新医学社）。

【0005】最近、アレルギーのうち食物アレルギー由来のアトピー性皮膚炎において、Tリンパ球に発現する皮膚へのホーミングレセプター：CLA（皮膚リンパ関連抗原cutaneous lymphocyte antigen）が注目を集めている。CLAはすでに、Tリンパ球の皮膚へのホーミングレセプターとして知られていたが、新たに、皮膚の血管内皮細胞に多く発現する接着分子であるE-セレクチンと接着すること、アトピー性皮膚炎患者の皮膚に浸潤したTリンパ球にCLAの発現が多いこと、アトピー症状を示す患者のリンパ球が抗原刺激によりCLAを高発現することが分かってきた（日本農芸化学会 1997年度大会（要旨集）、臨床栄養 Vol.90 No.7 p774-779 1997.6）。これらのことから、リンパ球上のCLAは、アトピー症状を引き起こす炎症細胞が、皮膚で発症するのを決定するのに関与していると考えられる。

【0006】アトピー性皮膚炎における食物アレルギーの関与については、国立療養所東高知病院の小倉ら（ア

レルギーの臨床 15(4) 254-257 1995、臨床栄養 Vol. 19 No. 7 787-793 1997.6)によれば、日本人のアトピー性皮膚炎患者の93.7% (209例/223例) に一つ以上の食物アレルゲンの関与を認めており、アトピー性皮膚炎と食物アレルギーとは密接な関係にあることが考えられる。

【0007】これらの知見を総合すると、食物アレルギー由来のアトピー性皮膚炎は、アレルゲンが腸管から吸収されたのち、血中に移行し、Tリンパ球を活性化してCLAを誘導発現する。Tリンパ球上に発現したCLAは、標的細胞である皮膚の血管内皮細胞上に常在するE-セレクチン及びサイトカインによって誘導されたE-セレクチンと細胞接着を起こし、この接着を発端としてIV型アレルギー（遅延型反応）の特徴である白血球の浸潤を導く。具体的には、(1)セレクチンの関与する白血球のローリング、(2)白血球の活性化、(3)インテグリン(LFA-1、Mac-1等)とIgスーパー・ファミリー(ICAM-1、ICAM-2、VCAM-1等)が関与する強固な接着、(4)血管壁の通過の4段階の過程を経て白血球の浸潤が生じ、慢性のアトピー性皮膚炎へと導かれていくと考えられる。そこで、白血球、特にTリンパ球上のホーミングレセプター(CLA)と血管内皮細胞上の接着分子(E-セレクチン)の接着の抑制、もしくは細胞接着分子(E-セレクチン、ICAM、VCAM等)の発現の阻害をターゲットとした白血球細胞接着抑制剤を開発することによって、アトピー性皮膚炎、IV型アレルギーの予防・治療効果が得られるものと考えられる。

【0008】すなわち、これら抑制剤は従来の抗炎症薬とは異なった機作により、アトピー性皮膚炎を阻止、軽減することができ、新しいタイプのアトピー性皮膚炎の予防ないし治療剤として有用である。

【0009】食物アレルギーの治療は食物を摂取したのち、症状が強く出現した場合の対症療法と予防的治療の2つに分けられる。前者の対症療法には主に副腎皮質ホルモンを中心としたステロイド剤、抗ヒスタミン剤、抗炎症剤、抗アレルギー剤などが広く用いられ、中でも、ステロイドを短期的に使用する治療法が主流である。しかし、いずれも薬理効果や長期使用による副作用等の問題を有している。予防的治療としては、原因抗原となる食物を除去する除去食療法と経口抗アレルギー薬を用いる方法に分けられる。前者の予防的治療では、アレルギー疾患において食物の関与が認められた場合は、これを除去することが治療の原則であるが、原因食物が卵、牛乳、大豆など良質のタンパク源であることが多く、患者の中心である成長過程にある小児においては重要な問題である。経口抗アレルギー剤の使用も有用だが、現在利用できる抗アレルギー剤の多くは、I型アレルギー反応に対する抗アレルギー剤で、IV型アレルギーに効果のある薬剤は少ない。そのため、経口抗アレルギー剤には現

在のところ、補助的な効果しか期待できず、しかも、その殆どが合成医薬品であり、副作用の点で問題がある。

【0010】そこで、アトピー性皮膚炎の治療には、現在使用されている治療剤にはない新しい効果、特に湿疹の発症に関与するIV型アレルギーの抑制効果を持ち、更に長期間服用可能な副作用の殆ど見られない予防ないし治療剤が求められている。

【0011】

【発明が解決しようとする課題】従って、本発明の目的は、白血球などの炎症関連細胞の接着というメカニズムを抑制することによってIV型アレルギー及びアトピー性皮膚炎の治療を行うことにある。具体的には白血球細胞接着の有効な抑制剤を、副作用のほとんど見られない生薬を中心とした植物から見出し、長期間使用可能な医薬品、医薬部外品、化粧品及び食品として提供することにある。

【0012】

【課題を解決するための手段】そこで、本発明者は、種々の植物またはその抽出物等について白血球細胞接着抑制作用を検討し、下記に示す植物が、意外にも優れた白血球細胞接着抑制作用を有しIV型アレルギー及びアトピー性皮膚炎の予防ないし治療剤として極めて有用であることを見出し、本発明を完成した。

【0013】本発明は、菊花、訶子、菱実、大根草、ウワウルシ、ヤロー、ローズ、クミンおよびクローブから選ばれる一種もしくは2種以上の抽出物を有効成分とするIV型アレルギー及びアトピー性皮膚炎の予防ないし治療剤、並びにIV型アレルギー及びアトピー性皮膚炎の予防ないし治療作用を有する化粧料及び食品組成物を提供するものである。

【0014】さらに、本発明は、アキノキリンソウ、オレンジ、クバク、キキョウ、ポットマリーゴールド、レッドペッパー、チモ、ホップ及びニンドウからなる群から選ばれる1種もしくは2種以上の植物またはその抽出物を有効成分とするIV型アレルギー及びアトピー性皮膚炎の予防ないし治療剤、並びにIV型アレルギー及びアトピー性皮膚炎の予防ないし治療作用を有する化粧料及び食品組成物を提供するものである。

【0015】本発明において、IV型アレルギーとしては、アトピー性皮膚炎の他、接触性皮膚炎、甲状腺炎、アレルギー性脳炎などが例示される。

【0016】本発明で用いる植物は、菊花(*Chrysanthemum spp.*)、訶子(*Terminalia chebula Retz.*)、菱実(*Trapa japonica FLEROV.*)、大根草(*Geum japonicum THUNB.*)、ウワウルシ(*Arctostaphylos uva-ursi SPR ENGEL*)、ヤロー(*Achillea millefolium*)、ローズ(*Rosa spp.*)、クミン(*Cuminum cyminum*)およびクローブ(*Eugenia aromatic/a/Syzygium aromaticum*)から選ばれるものである。

【0017】さらに、本発明で用いる他の植物は、アキ

ノキリンソウ (*Solidago virga-aurea*)、オンジ (*Polygonum radix*)、クバク (ナデシコ/セキチク (*Dianthus superbus L./D. chinensis L.*))、キキョウ (*Platycodon grandiflorus A. DC.*)、ポットマリーゴールド (キンセンカ (*Calendula officinalis L.*) レッドペッパー (*Capsicum annuum L.*)、チモ (ハナスグ (*Anemone rhena asphodeloides Bunge*)、特に根茎)、ホップ ((セイヨウカラハナソウ) (*Humulus lupulus L.*)、特に果穂)、ニンドウ (スイカズラ (*Lonicera japonica Thunb.*)、特に葉) からなる群から選ばれるものである。

【0018】菊花はキク科 (Compositae) の白菊花、甘菊花、抗菊花、安菊花等の菊の頭状花を乾燥したもので、日本では食用菊として用いられている。

【0019】訶子はシクンシ科 (Combretaceae) 植物のミロバラン (*Terminalia chebula Retz.*) の成熟果実を乾燥した生薬の一種である。

【0020】菱実はヒシ科 (Trapaceae) 植物の菱の果実を乾燥した生薬の一種で、食用とされている。

【0021】大根草はバラ科 (Rosaceae) の植物のダイコンソウの全草を刻んで乾燥したものである。

【0022】ウワウルシはツツジ科 (Ericaceae) のクマコケモモの葉を乾燥した生薬である。

【0023】ヤローは和名を西洋錫草と言い、キク科 (Compositae) の植物で、ヨーロッパではお茶として飲用されている。

【0024】ローズはバラ科 (Rosaceae) のバラの花を乾燥したハーブの一種で、食用にされている。

【0025】クミンはセリ科 (Umbelliferae) の植物で、主に種子を香辛料として用いている。

【0026】クローブはフトモモ科 (Myrtaceae) の和名丁子の蕾を乾燥させたもので、香辛料の一種である。

【0027】アキノキリンソウは、キク科 (Compositae) のアキノキリンソウの全草で、お茶として飲用されている。

【0028】オンジは、ヒメハギ科 (Polygalaceae) の植物で、イトヒメハギの根である。

【0029】クバクは、ナデシコ科 (Caryophyllaceae) のカワラナデシコやセキチクの花期の全草を乾燥したものである。

【0030】キキョウは、キキョウ科 (Campanulaceae) のキキョウの根である。

【0031】ポットマリーゴールドは、和名をキンセンカと言い、キク科 (Compositae) の植物で花は食用として用いられる。

【0032】レッドペッパーは、和名を唐辛子と言い、ナス科 (Solanaceae) の植物の成熟した果実で、主に香辛料として用いられる。

【0033】チモは、ユリ科 (Liliaceae) のハナスグの根茎である。

【0034】ホップは、和名をセイヨウカラハナソウと

言い、クワ科 (Moraceae) の植物ホップで、食用とされている。

【0035】ニンドウは、スイカズラ科 (Caprifoliaceae) のスイカズラの葉を乾燥したものである。

【0036】本発明においては斯かる植物の全草又は、葉、葉柄、花、果実、枝根、種子等が利用できる。これはそのまま又は乾燥して用いてもよいし、粉碎し、更に抽出物として用いてもよい。好ましくは、前記植物の抽出物が用いられる。

【0037】抽出方法は植物の一部又は全体の粉碎物を通常3~100°Cで水又は有機溶媒により抽出する方法が挙げられる。ここで抽出に用いられる有機溶媒は、特に限定されないが例えば、石油エーテル、シクロヘキサン、トルエン、ベンゼン等の炭化水素類、四塩化炭素、ジクロロメタン、クロロホルム等のハロゲン化炭化水素、エーテル類、酢酸エチル等のエステル類、アセトン等のケトン類、ブタノール、プロパンノール、エタノール、メタノール、ポリエチレンジリコール、プロピレンジリコール、ブチレンジリコール等のアルコール類、ビリジン等が挙げられる。抽出溶媒は単独で用いても、2種以上を混合して用いてもよい。好ましくは、含水エタノール、含水メタノールなどの含水アルコールが使用できる。更に好ましい方法としては、天産物の乾燥粉碎物を20倍量の水、20倍量の50%エタノール、または50倍量のメタノールを用い、室温~100°Cで2~24時間攪拌抽出する。

【0038】得られた抽出物は、そのまま用いてもよいが、更に必要により、濃縮、済過、凍結乾燥等の処理をしたもの用いてもよい。また抽出物や植物体は単独でも2種以上を組み合わせて用いてもよい。

【0039】かくして得られる上記植物抽出物は、白血球-血管内皮細胞間に代表される細胞接着を抑制する優れた作用を有し、細胞毒性が弱く、安全性も高いため、IV型アレルギー及びアトピー性皮膚炎の予防ないし治療剤、並びに予防ないし治療作用を有する化粧料及び食品組成物として有用である。

【0040】上記植物又はその抽出物の医薬品、医薬部外品、化粧品及び食品への配合量は、特に限定されていないが、一般的に乾燥固体分に換算して0.001~100重量%、特に0.01~50重量%とするのが好ましい。また、1日の投与(及び摂取量)は0.1mg/kg~1000mg/kgとするのが好ましく、1回または複数回に分けて投与される。

【0041】投与は、経口、非経口、外用(軟膏剤、乳剤、クリーム剤、貼付剤など)等いずれの経路によってもよい。また、特定保健用食品、JSD食品、特殊栄養食品、栄養補助食品、健康食品などに食品添加物として配合することもできる。なおこれらの植物および抽出物の安全性は高いことが知られている。

【0042】形態としては、IV型アレルギー及びアトピー性皮膚炎の予防ないし治療効果を期待できものであれば任意の形態をとることができ、例えば錠剤、散剤、顆

粒剤、カプセル剤、坐剤、トローチ剤などの固体(製剤)、シロップ、乳液、軟ゼラチンカプセル、クリーム、軟膏、流エキス、懸濁剤、ローション、チンキ、ゲル、ペースト、スプレー、注射などの液状(製剤)、茶剤、沐浴剤、煎剤等が挙げられる。

【0043】本発明の製剤は、形態に応じて、通常の医薬品、医薬部外品、化粧品、及び食品等の調製に使用される希釈剤、賦形剤等を配合することが好ましい。その他の添加剤としては特に限定されない。

【0044】本発明の食品組成物に含まれる食品成分としては、各種食品に、予防効果、抑制効果を期待して本発明の抽出物を添加、又はその植物体そのものをサラダ、香辛料、ティー等として用いることの可能なものもある。添加して用いる食品としては、各種食品に可能であるが、例示すれば飲料(ティー、清涼飲料等)、菓子類(コーンフレーク、クッキー、キャンディー、ゼリー等)、パン、めん類、練り製品(ソーセージ、カマボコ等)油脂、調味料(ドレッシング、ソース等)などが可能である。

【0045】本発明の化粧料には、化粧品に通常使用される成分、例えばバラ油、ジャスミン油、ラベンダー油、クローブ油、ペパーミント油、サンダルウッド油、シンナモン油、ペパー油、レモン油、オレンジ油などの天然香料、リモネン、リナロール、グランオール、シトロネロール、ターピネオール、ファルネソール、メントールなどの合成香料、ローズベンガル、レーキレッドC、ローダミンB、エオシン、フルオレセイン、ハンザエロー、インジゴカルミン、フタロシアニンブルー、ベンチジンオレンジ、ナフトブルーブラックなどの合成色素、β-カロチン、サフロールイエロー、アリザリン、シコニン、クロロフィル、ベタニンなどの天然色素、マイカ、タルク、カオリン、無水ケイ酸、酸化アルミニウム、酸化鉄、酸化クロム、群青、紺青、カーボンブラック、二酸化チタン、酸化亜鉛などの無機顔料、ソルビトール、グリセリン、ポリエチレングリコール、ヒアルロン酸ナトリウム、プロピレングリコールなどの保湿剤があげられる。

【0046】化粧料の形態としては、化粧水、乳液、ファウンデーション、口紅、クレンジングクリーム、マッサージクリーム、エモリエントクリーム、保湿クリーム、アストリンゼントローション、パック、洗顔料等が挙げられる。

【0047】本発明の医薬品、医薬部外品、化粧品及び食品等は常法により製造することができる。

【0048】

【発明の効果】本発明に用いた植物は副作用がなく、優れたIV型アレルギー及びアトピー性皮膚炎の予防ないし治療作用を有する。また、それらを医薬品、医薬部外品、化粧品及び食品として用いた場合にはアトピー性皮膚炎等IV型アレルギーが関与する疾患の予防や治療に効

果があり、広く用いられる。

【0049】

【実施例】次に実施例を挙げ本発明を更に詳細に説明するが、本発明はこれらに限定されるものではない。

【0050】本発明に実施例として、前記天然産物の抽出物の製造例ならびにその効果を示すための実施例を挙げるが、これらは本発明をなんら限定するものではない。

【0051】製造例1(熱水抽出)

以下の実施例で用いた植物抽出物は、次の方法により得た。

【0052】乾燥した菊花を粉碎し、この粉碎物2.0gに20倍量の水を加え、95°Cで2時間攪拌抽出した。この抽出液を遠心分離(10,000rpm、15min)により沈殿を除去し、上清を凍結乾燥によりこれら抽出物507mg(乾燥固体分25重量%)を得た。他の植物についても同様の操作により抽出物を得た。

【0053】製造例2(メタノール抽出)

乾燥した菊花を粉碎し、この粉碎物2.0gに50倍量のメタノールを加え、100°Cで2時間ソックスレー抽出法により抽出した。この抽出液を遠心分離(10,000rpm、15min)により沈殿を除去し、上清を減圧濃縮後、凍結乾燥によりこれら抽出物241mg(乾燥固体分12重量%)を得た。他の植物についても同様の操作により抽出物を得た。

【0054】製造例3(50%エタノール抽出)

乾燥した菊花を粉碎し、この粉碎物2.0gに20倍量の50%エタノールを加え、室温で24時間攪拌抽出した。この抽出液を遠心分離(10,000rpm、15min)により沈殿を除去し、上清を減圧濃縮後、凍結乾燥によりこれら抽出物468mg(乾燥固体分23重量%)を得た。他の植物についても同様の操作により抽出物を得た。

【0055】試験例1

白血球-血管内皮細胞接着抑制試験：以下の試験方法によって血管内皮細胞の接着分子の発現を抑えることで、細胞接着を抑制する物質を検討した。

【0056】・蛍光ラベルHL60細胞(ヒト骨髄腫瘍細胞)の調製

HL60細胞 2×10^7 個を、BCECF-AM50μgを用い、37°Cで30分間インキュベートし、蛍光ラベルした。新しい培養液で洗浄後、細胞濃度が 1×10^6 cells/mlになるように培養液にて調製した。

【0057】・細胞接着抑制試験

96ウェル 平底プレート(flatbottom plate)上にコンフルエントとなったヒト血管内皮細胞(HUVEC)に対し、最終濃度[乾燥固体分](以下同じ)0.1mg/mlとなるように被験抽出物を添加した。18時間後にヒトIL-1β(Genzyme社製)を最終濃度10units/mlとなるように50μl/well添加し、37°Cで4時間培養した。培養液除去後、新しい培養液で2回洗浄し、あらかじめ常法に従い蛍光標識したヒト骨髄腫瘍細胞(HL60) 1×10^6 cells/ml

1を $100\mu\text{l}/\text{well}$ 添加し、37°C、CO₂インキュベーター中で反応した。15分後、未接着細胞を除去し、新しい培養液及び0.1% SDS溶液を各 $100\mu\text{l}/\text{well}$ 添加し、接着細胞を溶解させた。溶解後の蛍光強度を蛍光プレートリーダー(Ex490nm, Em530nm)で測定した。尚、試料の代わりに精製水を添加したものを対照とし、試料、IL-1 β を入れないブランクを設定し、次式により細胞接着抑制率を求めた。その結果、表1に示すように抽出物は細胞接着抑制効果を有することが判明した。また、表2には3種類の抽出方法(製造例1~3の方法)を用

いた場合の抽出物の効果を示した。いずれの抽出物を用いた場合でも、細胞接着抑制効果が認められ、IV型アレルギーを抑制し、アトピー性皮膚炎に有効であると考えられた。

【0058】

【数1】細胞接着抑制率(%) = [(1 - (試料F値 - ブランクF値) / (対照F値 - ブランクF値)) × 100
〔式中、F値は蛍光強度値を示す。〕

【0059】

【表1】

植物エキス(製造例3)	白血球細胞接着抑制率(%)
菊花	38
訶子	88
菱実	88
大根草	52
ウワウルシ	99
ヤロー	29
ローズ	41
クミン	54
クローブ	18

【0060】

【表2】

白血球細胞接着抑制率(%)		
菊花		
製造例1	27	
製造例2	31	
製造例3	38	
訶子		
製造例1	80	
製造例2	95	
製造例3	88	

試験例2 血管内皮細胞上の接着分子発現抑制試験

試験例1(製造例3)で効果の見られた物質について、細胞接着に関するいずれの接着分子の発現を阻害するものかを検討した。

【0061】96ウェル 平底プレート(flatbottom plate)上にヒト血管内皮細胞(HUVEC)をコンフルエントになるまで37°C、CO₂インキュベーターで培養する。培養液でウェルを洗浄後、最終濃度0.1mg/mlとなるように被験抽出物をウェルに添加し培養する。18時間後、最終濃度10units/mlとなるようにヒトIL-1 β (Genzyme社製)を $50\mu\text{l}/\text{well}$ 添加し、37°Cで4時間インキュベートすることにより活性化し、接着分子を誘導発現させる。活性化後ウェルを洗浄液(0.5% BSA-PBS+)で洗浄す

る。1000倍、2000倍に洗浄液で希釈したビオチン化抗体溶液(E-セレクチン; BBA8、ICAM-1; BBA9(R&Dシステムズ社製))を $50\mu\text{l}$ 添加し、室温で1時間静置する。洗浄液でウェルを洗浄する。2000倍に洗浄液で希釈したパーオキシダーゼ標識ストレプトアビジン(ペーリングーマンハイム製)溶液を $50\mu\text{l}$ 添加し、室温で1時間静置する。洗浄液でウェルを洗浄後、酢酸緩衝液(50mM酢酸ナトリウム緩衝液pH5.2)100μl、基質溶液(4mM o-フェニレンジアミン、0.05% H₂O₂/酢酸緩衝液)100μlをウェルに添加し、室温で5分酵素反応を行う。停止液(0.8M硫酸)50μlを添加して反応を止める。マイクロプレートリーダーにて測定波長492nm、対照波長630nmで吸光度を測定する。なお、試料の代わりに精製水を入れたものを対照とし、試料及びIL-1 β を入れないブランクを設定して、HUVEC上の接着分子の発現抑制量を次式により求めた。結果を表3に示す。

【0062】

【数2】接着分子発現抑制率(%) = [(1 - (試料O.D.値 - ブランクO.D.値) / (対照O.D.値 - ブランクO.D.値)) × 100
〔式中、O.D.値は吸光度値を示す〕

【0063】

【表3】

植物エキス	E-セレクチン発現抑制率(%)	ICAM-1発現抑制率(%)
菊花	16	22
訶子	0	91
菱実	0	31
大根草	1	0
ウワウルシ	0	53

ヤロー	28	25
ローズ	0	44
クミン	62	24
クローブ	5	21

表3の結果から、クミンは主としてE-セレクチンの発現を阻害することによって、一方、調子、ウワウルシ、ローズは主としてICAM-1の発現を阻害することによって、細胞接着を抑制するものと考えられた。また、大根草は、これら以外の要因によって細胞接着を阻害しているものと予想された。

【0064】試験例3 白血球-E-セレクチン接着抑制試験：以下の方法で、E-セレクチンに対して白血球と拮抗的に作用する物質を検討した。

【0065】・E-セレクチンをコートしたプレートの作製

96ウェルマイクロプレート(Immilon 4、ダイナテック製)にヒトリコンビナントE-セレクチン(R&Dシステムズ製)800ng/ml PBS+を100μlずつ添加し、4℃で一晩コートする。ウェルを1%BSA(ウシ血清アルブミン)を含むPBS+溶液250μlで室温1時間ブロッキングし、PBS+で洗浄を行う。

【0066】・蛍光ラベルHL60細胞の調製

常法により培養したHL60(ヒト骨髄腫瘍細胞)2×10⁷個をBCECF-AM(モレキュラープローブ製)50μg/培地1.5mlにて細胞を懸濁する。37℃で30分インキュベートし、細胞を蛍光ラベルする。培養液で洗浄し、0.1%BSAを含むPBS+で2×10⁶個/mlに調製する。

【0067】・細胞接着抑制試験

植物エキス (50%エタノール抽出、0.4mg/ml)	白血球細胞接着抑制率 (%)
アキノキリンソウ	99
オニシ	98

【0070】

植物エキス (50%エタノール抽出、2mg/ml)	白血球細胞接着抑制率 (%)
クバク	100
キキョウ	100
ポットマリーゴールド	91
レッドペッパー	83
チモ	68
ホップ	68
ニンドウ	68

上記のように、本発明の有効成分は、白血球の細胞接着を抑制することができ、IV型アレルギーと関係の深いアトピー性皮膚炎の予防ないし治療効果を有することが明らかとなった。

【0071】試験例4 IV型アレルギーに対する効果

1) IV型アレルギー皮膚炎の惹起

7%塩化ピクリル・エタノール溶液0.1mlをテルモシリ

E-セレクチンをコートした平底プレートの各ウェルに、所定濃度の(最終濃度0.4または2mg/ml 0.1%BSA-PBS+となるように)試験抽出物50μlを添加し(対照としては0.1%BSA-PBS+のみ50μlを添加)、室温で20分静置させて反応する。次に蛍光ラベルしたHL60細胞を1×10⁵個(2×10⁶個/mlの前記溶液を50μl)添加し、室温で10分反応させる。プレートウォッシャー機(DIA-Washer(2)、ダイアヤトロン製)を使用し、洗浄液(0.5%BSA-PBS+)で各ウェルを1.0mlで2回洗浄し、未接着の細胞を除去する。洗浄溶液を吸引除去した後、0.1%SDS溶解液を100μl添加し、室温で20分静置して、E-セレクチンに接着した細胞を溶解する。溶解液の蛍光強度を蛍光プレートリーダー(MTP-100F、コロナ製)でEx490nm、Em530nmで測定する。ブランクとしてE-セレクチンを未コートとしたウェルで対照溶液について細胞接着抑制試験を行う。細胞接着抑制率を、次式により求めた。結果を表4、5に示す。

【0068】

【数3】細胞接着抑制率(%)=[1-(試料F値-ブランクF値)/(対照F値-ブランクF値)]×100
(式中、F値は蛍光強度値を示す)

【0069】

【表4】

【表5】

ンジを用い、剪毛したBALB/C系雄性マウス(7週齢、一群5匹)の腹部に塗布し(面積:25×15mm)感作した。感作後6日目に、7%塩化ピクリル・アセトン溶液をマイクロピッパーを用い右耳表裏に10μlずつ塗布し、皮膚炎を惹起した。

【0072】2)被験抽出物の塗布

被験抽出物はエタノールに溶解し、抗原塗布の30分前

及び3時間後にマイクロピッパーを用い $25\mu l$ ずつ右耳表裏に塗布した。なお、薬物投与後、後肢等が耳に届かないように首かせをした。

【0073】3) 耳浮腫の測定

被験抽出物塗布直前、抗原塗布24及び72時間後に厚み測定器(thickness gauge)を用いて左右の耳介の厚さを測定した。

【0074】4) 腫脹率及び抑制率の計算方法

左耳に対する右耳の腫脹率及び抑制率を次式により求め

被験抽出物	投与量 (mg/kg)	抑制率(%)	
		1日目	3日目
コントロール	—	0	0
菊花	30	33.1	22.0
大根草	30	38.3	22.3
ヤロー	30	21.5	31.3
グアバ葉	30	18.3	22.1

表6の結果から、被験抽出物を塗布したマウスの耳介の腫れは、コントロールに比べて有意に抑制され、被験抽出物がIV型アレルギーに効果を有することが確認された。

【0077】なお、グアバ葉は、アトピー性皮膚炎に対する有効性が確認されているため、陽性対照物として用いた(月刊フードケミカル1997-1)。

【0078】本発明の抽出物は、グアバ葉と同等以上のIV型アレルギー抑制効果を有することが明らかになった。

【0079】試験例5 血管内皮細胞に対する毒性試験(細胞形態、細胞増殖能)：形態的変化に対しては、倒立型顕微鏡による目視判定とし、細胞増殖能は常法に従いCell Counting Kit(同仁化学)を用い、ヒト血管内皮細胞(HUVEC)へのWST-1(テトラゾリウム塩類)の取り込みを指標とし評価した。ヒト血管内皮細胞はコンフルエントとなるように、96ウェル 平底プレート(flatbottom plate)に培養し、最終濃度0.1mg/mlとなるように

た。結果を表6に示す。

【0075】

【数4】腫脹率(%) = [抗原投与耳(右耳)の厚さ / 抗原非投与耳(左耳)の厚さ] × 100

抑制率(%) = [(各マウスの腫脹率 - 100) / コントロール群(被験抽出物塗布なし)の腫脹率 - 100)] × 100

【0076】

【表6】

被験物質を添加した。37°C、24時間培養後培養液を除去し、新しい培養液を添加し100μl/wellとした。さらに、Cell Counting Kit溶液を10μl/well添加し37°C、CO₂インキュベーター内2時間培養し呈色反応した。反応後、吸光度をマイクロプレートリーダー(測定波長450nm、参照波長630nm)を用いて測定した。尚、試料の代わりに精製水を入れたものを対照とし、ヒト血管内皮細胞、試料の入っていないブランクを設定し、次式により細胞増殖能抑制率を求めた。その結果、表7に示すように、本植物エキスはいずれもヒト血管内皮細胞に対し、低毒性であった。

【0080】

【数5】細胞増殖能抑制率(%) = [1 - (試料O.D.値 - ブランクO.D.値) / (対照O.D.値 - ブランクO.D.値)] × 100

(式中、O.D.値は吸光度値を示す)

【0081】

【表7】

植物エキス	形態変化	細胞増殖能抑制率(%)
菊花	特になし	0
詞子	特になし	19
菱実	特になし	32
大根草	特になし	0
ウワウルシ	特になし	0
ヤロー	特になし	0
ローズ	特になし	32
クミン	特になし	13
クローブ	特になし	41
アキノキリンソウ	特になし	39
オレンジ	特になし	48
クバク	特になし	—
キキョウ	特になし	2
ポットマリーゴールド	特になし	4
レッドペッパー	特になし	3

チモ	特になし	11
ホップ	特になし	0
ニンドウ	特になし	17

実施例1 錠剤

下記の配合量で各成分を使用し、常法に従って錠剤を調製した。

【0082】

成 分	配合量 (%)
製造例3 菊花50%エタノール抽出物	83.4
トウモロコシデンプン	4.8
結晶セルロース	8.3
カルボキシメチルセルロースカルシウム	3.5

実施例2 顆粒剤

下記の配合量で各成分を使用し、常法に従って顆粒剤を調製した。

【0083】

成 分	配合量 (%)
製造例1 菊花50%エタノール抽出物	25.3
乳糖	58.9
トウモロコシデンプン	14.7
ヒドロキシプロピルセルロース	1.1

実施例3 散剤

下記の配合量で各成分を使用し、常法に従って散剤を調製した。

【0084】

成 分	配合量 (%)
製造例2 菊花メタノール抽出物	10.0
乳糖	80.0
トウモロコシデンプン	10.0

実施例4 細粒剤

下記の配合量で各成分を使用し、常法に従って細粒剤を調製した。

【0085】

成 分	配合量 (%)
製造例2 菊花メタノール抽出物	0.1
D-マンニトール	44.7
乳糖	42.0
結晶セルロース	10.0
ヒドロキシプロピルセルロース	3.2

実施例5 カプセル剤

下記の配合量で各成分を使用し、常法に従ってカプセル剤を調製した。

【0086】

成 分	配合量 (%)
製造例3 菊花50%エタノール抽出物	57.7
乳糖	26.9
トウモロコシデンプン	14.6
ステアリン酸マグネシウム	0.8

実施例6 注射剤

下記の配合量で各成分を使用し、常法に従って注射剤を

調製した。

【0087】

成 分	配合量 (%)
製造例1 菊花热水抽出物	0.5
塩酸	5.0
水酸化ナトリウム	適量
注射用蒸留水	適量

実施例7 茶剤(粉末)

下記の配合量で各成分を使用し、常法に従って茶剤を調製した。

【0088】

成 分	配合量 (%)
製造例1 菊花热水抽出物	16.5
デキストリン	82.5
ビタミン類	1.0

実施例8 化粧水

下記の配合量で各成分を使用し、常法に従って化粧水を調製した。

【0089】

成 分	配合量 (%)
製造例1 菊花热水抽出物	2.0
エステルマグネシウム	3.0
プロピレングリコール	2.0
オキシベンゾン	5.0
クエン酸	適量
バラオキシ安息香酸エステル	0.5
精製水	適量
香料	0.5
着色剤	微量

実施例9 浴用剤

下記の配合量で各成分を使用し、常法に従って浴用剤を調製した。

【0090】

成 分	配合量 (%)
製造例1 菊花热水抽出物	10.0
炭酸水素ナトリウム	50.0
無水硫酸ナトリウム	30.0
酸化チタン	5.0
色素	微量
香料	微量
ポリエチレングリコール	適量

実施例10 クリーム

下記の配合量で各成分を使用し、常法に従ってクリームを調製した。

【0091】

成 分	配合量 (%)
製造例2 菊花メタノール抽出物	5
モノステアリン酸グリセリル	5
モノステアリン酸ポリエチレングリコール	2
スクワラン	8
トリオクタン酸グリセリル	8
ステアリルアルコール	5.5
ジメチルポリシロキサン	0.2
プロピレングリコール	5.0
防腐剤	適量
精製水	バランス

実施例11 コーンフレーク

下記の配合量で各成分を使用し、常法に従ってコーンフレークを調製した。

【0092】

成 分	配合量 (%)
製造例2 菊花メタノール抽出物	0.2
コーングリット	87.1
糖類	11.0
食塩	1.7

実施例12 即席麺

下記の配合量で各成分を使用し、常法に従って即席麺

(ノンフライ麺)を調製した。

【0093】

成 分	配合量 (%)
製造例2 菊花メタノール抽出物	0.1
小麦粉	79.7
植物蛋白	9.7
でんぶん	5.0
その他	5.5

フロントページの続き

(51)Int.Cl.	識別記号	F I	
A 61 K 35/78		A 61 K 35/78	V
			W
	ABF		ABFH
A 23 L	1/162	A 23 L	1/162
	1/164		1/164
	1/30		1/30
	2/38		2/38
A 61 K	7/00	A 61 K	7/00
			K
	7/48		7/48
	7/50		7/50
(72)発明者	杉本 守	(72)発明者	石井 隆幸
	大阪府大阪市淀川区西中島4丁目1番1号		埼玉県川越市石原町1丁目24-3 朝日パ
	日清食品株式会社内		リオ川越402